

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09444

研究課題名(和文) 骨肉腫に対してmTOR阻害剤とバルプロン酸を併用する新たな治療戦略の確立

研究課題名(英文) Combination therapy with epigenetic modulators hydralazine and sodium valproate as a novel therapeutic strategy for osteosarcoma.

研究代表者

鉢谷 博之(Futani, Hiroyuki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：30248140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺転移抑制は骨肉腫患者の予後改善に残された命題である。これに対して化学療法単独では限界が指摘されている中、本研究はその限界を超えることができる重要な研究と考える。化学療法に加えてヒストン脱アセチル化阻害剤の併用は、骨肉腫の肺転移抑制に対する新たな治療戦略で、他に例をみない独創的な研究である。腫瘍による新生血管の抑制と、細胞死の誘導が増強されて、骨肉腫の肺転移に対する抑制効果を相加・相乗的に亢進させることを明らかにした。本研究に用いる薬剤は、既に異なる疾患に臨床応用されて安全性が証明されており、本研究成果を早急に臨床応用することができる点においても意義がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫の肺転移抑制に、ヒストン脱アセチル化阻害剤(HDAC)の効果と作用機序を明らかにした。HDACのバルプロン酸は、ヒト骨肉腫細胞(OS)とヒト毛細血管内皮細胞(HMVE)に作用してSemaphorin3A(SEMA3A)とそのレセプターであるNeuropilin1(NRP1)とPlexinA1(PLXNA1)の発現を亢進させ、HMVEの管腔形成阻害を認め、SEMA3Aの亢進はG1/S細胞周期チェックポイントを制御して、OSの増殖抑制を認めた。以上、HDACはSEMA3A/NRP1/PLXNA1の経路を介して、骨肉腫の血管新生と細胞増殖を抑制できることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin(SEMA)3A is an endogenous angiogenesis inhibitor associated with endothelial cell proliferation, which suppresses tumor angiogenesis. In this study, the role of histone deacetylase (HDAC) inhibitors is evaluated to enhance the SEMA3A expression in osteosarcoma (OS) cells, thereby suppressing angiogenesis and inhibiting their proliferation and metastasis. OS cell lines and human microvascular endothelial (HMVE) cells were treated with sodium valproate (VPA) of HDAC inhibitor. VPA increased the expression of SEMA3A and its receptor NRP1 in both OS and HMVE cells. SEMA3A induced by VPA in OS cell culture medium inhibited vascular tube formation of HMVE cells, and overexpression of SEMA3A enhanced OS cell growth inhibition. This growth-inhibitory effect of SEMA3A induced G1/S cell cycle arrest in OS cells. In conclusion, HDAC inhibitors have anti-angiogenic and anti-tumor activities that can be, in part, mediated via the SEMA3A/NRP1/PLXNA1 autocrine and paracrine pathways.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 転移 血管新生 血行性転移抑制 エピジェネティック試薬

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は若者に発生する高悪性骨腫瘍である。抗癌剤による化学療法の進歩により5年生存率は10%から70%程度にまで飛躍的に向上した。しかし、その後に治療法に画期的な進歩はなく、30%程度の患者は肺転移によって悲惨な経過をたどる。これらの患者の予後を改善するには、肺転移を抑制するための新たな治療戦略が必須である。

近年、腫瘍新生血管形成の抑制効果が注目されている。軟部肉腫に対して、vascular endothelial growth factor(VEGF)に対する中和抗体やVEGF受容体などを標的とするキナーゼ阻害薬が治療薬として使用されている。

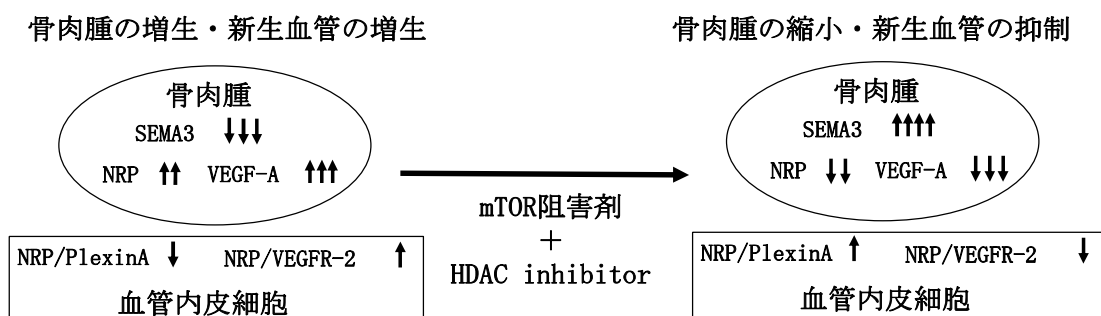
骨肉腫の転移機序において、血管新生はVEGFによって血管新生が誘導されていることが既に報告されている。よって、骨肉腫治療に、腫瘍血管新生抑制をターゲットとした新たな治療法の確立を目指した。

2. 研究の目的

骨肉腫の最大の予後不良因子である肺転移を抑制するには、抗癌剤のみの治療では限界がある。我々はエピジェネティック試薬であるヒストン蛋白アセチル化阻害剤のバルプロン酸が免疫細胞の効果を高め、肺転移を抑制することを明らかにした。

この免疫療法の精度を高めるため、肺転移の機序に必須である新生血管を抑制することが重要である。バルプロン酸は、低酸素状態でのHypoxia-inducible Factor 1(HIF-1)という転写因子の活性化を抑制しVEGF産生を抑制する事が報告されている。骨肉腫の肺転移を抑制するためには、腫瘍新生血管形成を抑制することが重要であると考えられる。

Semaphorin(SEMA)、およびneuropilin(NRP)は、神経細胞の軸索伸長の制御因子とされていたが、その後、血管形成や腫瘍細胞の増殖にも抑制的な役割を担うことが、明らかになってきた。特にクラス3セマフォリン(SEMA3)は分泌型として産生されリガンドとして働き、主に血管内皮細胞に発現しているNRPはプレキシA(PlexinA)と複合体を形成し、SEMA3の機能的な受容体として血管新生に抑制的な働きをしている。しかし、NRPはVEGFR2とも共受容体を形成しVEGFと結合する。このことから、NRPはSEMA3およびVEGFの共受容体として作用し、病的血管新生や脈管形成および血管透過性を制御する役割を担っている。しかし、SEMA3は多くの癌組織でその発現が抑制されている。その結果、癌はVEGF/VEGFR2/NRPを介する血管新生の優位な状態になっていると考える。そこで今回、我々はepigenetic modulatorであるバルプロン酸とmTOR阻害剤を用いSEMA/NRPを介する血管新生抑制機構を亢進し、骨肉腫の増殖抑制および肺転移の抑制を目的とする。



3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫細胞株(U2-OS, SaOS-2)とヒト毛細血管内皮細胞(HMVE)におけるSEMA3Aおよび受容体(NRP1, PlexinA1)の発現を確認する。

mRNAの発現をRT-PCRにて、蛋白発現をWestern blot法にて確認する。

(2) ヒストン脱アセチル化阻害(VPA, TSA)がヒト骨肉腫細胞株におけるSEMA3A, NRP1, PlexinA1の発現に及ぼす影響を確認する。

VPA および TSA によるヒストン脱アセチル化効果をアセチル化抗体にて確認する。
VPA を U2-OS, SaOS-2 に作用させ、3 日目と 7 日目における SEMA3A, NRP1, PlexinA1 の発現の変化をリアルタイム PCR にて評価する。
可溶性 SEMA3A の発現量の変化を培養上清にて ELISA 法で評価する。

- (3) ヒストン脱アセチル化阻害剤がヒト毛細血管内皮細胞株における SEMA3A, NRP1, PlexinA1 の発現および増殖能におよぼす影響を確認する。
解析方法は上記(2)に準ずる。
増殖抑制効果は MTT 法および Tube formation(管腔形成)にて測定して評価する。
- (4) 骨肉腫(由来)産生 SEMA3A が HMVE の増殖に及ぼす影響について評価する。
上記(2)で得られた培養上清をヒト血管内皮細胞株と共培養し、その増殖能を MTT 法および Tube formation(管腔形成)にて測定、評価する。
- (5) SEMA3A がヒト骨肉腫細胞増殖抑制に及ぼす直接的効果を MTT 法および生細胞数測定にて評価する。
SEMA3A 発現ベクターを作成し、強発現株と VPA 作用にて評価する。
- (6) 増殖抑制効果のメカニズムを検索する。

4. 研究成果

- (1) ヒストン脱アセチル化阻害剤によるヒト骨肉腫細胞株(OS)における SEMA3A, NRP1, PlexinA1 の発現に及ぼす影響。
OS における SEMA3A, NRP1, PlexinA1 mRNA の発現を認めた。
VPA および TSA 作用群で SEMA3A と NRP1 の mRNA および蛋白発現の増加が認められた(3.0~4.0 倍)が PlexinA1 に関しては増加傾向を示したが有意差は認めなかった。
- (2) ヒト毛細血管内皮細胞(HMVE)におけるヒストン脱アセチル化阻害剤による細胞増殖能に関する検討。
VPA および Hy 作用群は対照群との比較で増殖能に有意差は認めなかった。
- (3) ヒストン脱アセチル化阻害剤による HMVE における SEMA3A, NRP1, PlexinA1 発現に及ぼす影響。
OS における SEMA3A, NRP1, PlexinA1 mRNA の発現を認めた。
VPA および TSA 作用群で SEMA3A, NRP1, PlexinA1 の mRNA および蛋白発現の増加が認められた(2.5~5.0 倍)。
- (4) OS および HMVE におけるヒストン脱アセチル化阻害剤の作用による可溶性 SEMA3A の発現に及ぼす影響。
VPA および TSA 作用群で OS 細胞株の培養液中の可溶性 SEMA3A を約 2.0~3.5 倍程度、HMVE では約 2.5~3.0 倍程度増加させた。
- (5) OS(由来)産生 SEMA3A がヒト血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響に関する検討。
VPA 直接作用群では HMVE の管腔形成能を有意に抑制したが、HMVE の細胞死は認めないことから、増殖抑制を認めた。
前処置 OS 培養液で HMVE を培養で、管腔形成を有意に阻害した。

ヒト毛細血管内皮細胞の管腔形成抑制はヒストン脱アセチル化阻害剤の作用による SEMA3A と、その受容体の発現亢進によることが判明した。

また、VPA 前処置 OS 培養液でも管腔形成抑制効果を示すことから、SEMA3A の paracrine 効果の亢進を証明した。

- (6) SEMA3A 発現ベクター導入 SEMA3A 強発現
OS とヒストン脱アセチル化阻害剤作用群との比較検討。
ベクター導入(SEMA3A 強発現ヒト骨肉腫細胞株)は可溶性 SEMA3A を 8~9 倍増加させた。
VPA は作用後 7 日目において、OS 細胞株に有意に細胞死を誘導した。

SEMA3A 強発現ヒト骨肉腫細胞株は 48 時間後の OS 細胞株では約 60%の減少を認めた。

(7)SEMA3A 増殖抑制効果メカニズムの検証 .VPA と SEMA3A 強発現ヒト骨肉腫細胞株で細胞周期関連蛋白 p27 , cyclinE および Fbw7 蛋白の有意な発現の亢進を認めた。

OS の細胞増殖抑制メカニズムは G1/S 期による細胞周期拘束の誘導であり ,VPA によって発現が亢進した SEMA3A/NRP1/PlexinA1 の経路 (autocrine 効果) によることが示唆された。

以上より ,ヒストン脱アセチル化阻害剤である sodium valproate (VPA) および Trichostatin A (TSA) は ,SEMA3A/NRP1/PlexinA1 による腫瘍新生血管抑制 (paracrine 効果) が期待できることを明らかにした。

また SEMA3A/NRP1/PlexinA1 の発現亢進は細胞周期の拘束による骨肉腫細胞の増殖抑制 (autocrine 効果) を有する事を証明した。

VPA は既に抗てんかん薬として ,現在広く臨床応用されており ,安全性・至適濃度はすでに確認されている。

今回使用した濃度はその範囲内であることから ,人体への影響が少なく骨肉腫の治療に応用可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 SAWAI TATSUO、YAMANEGI KOJI、NISHIURA HIROSHI、FUTANI HIROYUKI、TACHIBANA TOSHIYA	4. 巻 43
2. 論文標題 Sodium Valproate Enhances Semaphorin 3A-mediated Anti-angiogenesis and Tumor Growth Inhibition in Human Osteosarcoma Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2539 ~ 2550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.16421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Futani Hiroyuki、Kawaguchi Takayuki、Sawai Tatsuo、Tachibana Toshiya	4. 巻 143
2. 論文標題 Osteoscopic versus open surgery for the treatment of enchondroma in the foot	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery	6. 最初と最後の頁 4899 ~ 4905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00402-023-04816-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Futani Hiroyuki、Kawaguchi Takayuki、Sawai Tatsuo、Tachibana Toshiya	4. 巻 12
2. 論文標題 Treatment Strategy of Fractured Osteochondroma in the Young Athlete 's Knee	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3615 ~ 3615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12113615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 TANIGUCHI JUNICHI、TAKAKI HARUYUKI、KODAMA HIROSHI、KAWAGUCHI TAKAYUKI、TAKAHAGI MOTONORI、OGASAWARA ATSUSHI、KAKO YASUKAZU、KOBAYASHI KAORU、MINAMI TETSUYA、FUTANI HIROYUKI、YAMAKADO KOICHIRO	4. 巻 37
2. 論文標題 Clinical Utility of Bland Embolization Using Microspheres for Painful Malignant Musculoskeletal Tumors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1816 ~ 1821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.13272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Shota, Iseki Tomoya, Tachibana Toshiya, Futani Hiroyuki	4. 巻 2023
2. 論文標題 Bacillus Calmette-Guerin osteomyelitis of the fifth metatarsal bone in a Japanese infant: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jscr/rjad362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Futani Hiroyuki, Kawaguchi Takayuki, Sawai Tatsuo, Tachibana Toshiya	4. 巻 143
2. 論文標題 Osteoscopic versus open surgery for the treatment of enchondroma in the foot	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery	6. 最初と最後の頁 4899 ~ 4905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00402-023-04816-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omote Maya, Tsubamoto Hiroshi, Ide Yoshihiro, Kawai Kenichiro, Futani Hiroyuki, Shibahara Hiroaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Extraskeletal Myxoid Chondrosarcoma of the Vulva: A Case Report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7759/cureus.33601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Futani Hiroyuki, Takaki Haruyuki, Sawai Tatsuo, Taniguchi Junichi, Kako Yasukazu, Ide Yoshihiro, Yamakado Koichiro, Tachibana Toshiya	4. 巻 100
2. 論文標題 Long-term survival following radiofrequency ablation of lung metastases in an elderly patient with calcaneal osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e26681 ~ e26681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000026681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima K, Futani H, Komoto H, Tsuchitani T, Takahashi Y, Tachibana T, Yamakado K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Quantitative bone SPECT/CT applications for primary bone neoplasms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hell J Nucl Med	6. 最初と最後の頁 36-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1967/s002449912304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara Yuki, Yamanegi Koji, Nagasawa Yasuyuki, Yoshida Ayu, Goto Yukako, Kumanishi Shunsuke, Futani Hiroyuki, Fukunishi Shigeo, Yoshiya Shinichi, Nishiura Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Programmed cell death 1 positive lymphocytes at palate tonsils in the elder patients with chronic tonsillitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100898 ~ 100898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima K., Futani H., Tsuchitani T., Takahashi Y., Yamakado K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Quantitative Bone Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography for Evaluating Response to Bisphosphonate Treatment in Patients with Paget's Disease of Bone.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Oncol	6. 最初と最後の頁 829-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000507663.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima K., Futani H., Tsuchitani T., Takahashi Y., Tachibana T., Yamakado K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Quantitative bone SPECT/CT applications for cartilaginous bone neoplasms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hell J Nucl Med	6. 最初と最後の頁 133-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1967/s002449912102.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama R., Hayakawa K., Kobayashi E., Endo M., Asano N., Yonemoto T., Kawashima H., Hamada K., Watanabe I., Futani H., Goto T., Nishida Y., Ozaki T.	4. 巻 478
2. 論文標題 What Factors Are Associated with Treatment Outcomes of Japanese Patients with Clear Cell Chondrosarcoma?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Orthop Relat Res	6. 最初と最後の頁 2537-2547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000001266.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura K, Ikeda M, Futani H, Hamanaka M, Kataoka K, Beppu N, Yoshiya S, Tomita N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Laparoscopic resection of a dumbbell-shaped lipoma extending through the obturator foramen: A case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endosc Surg	6. 最初と最後の頁 114-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.12700.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 麩谷 博之、熊西 俊介、橘 俊哉	4. 巻 1
2. 論文標題 鏡視下手術の進歩--小関節から脊椎まで . 膝関節 骨巨細胞腫に対する骨髄鏡手術の活用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 別冊整形外科	6. 最初と最後の頁 229 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15106/j_besei77_229	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長尾 和磨、麩谷 博之、鈴木 伸芳、澤井 龍生、井出 良浩、橘 俊哉	4. 巻 73
2. 論文標題 臨床室 中年の大腿骨骨幹部に発生した小細胞型骨肉腫の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 446 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 麩谷 博之、川口 貴之、橘 俊哉	4. 巻 40
2. 論文標題 特集 運動器エコーのエキスパートを目指そう 軟部腫瘍の診療における超音波検査の活用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 関節外科 基礎と臨床	6. 最初と最後の頁 174 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 澤井龍生、山根木康嗣、麩谷 博之、川口 貴之、橘俊哉
2. 発表標題 セマフォリン発現増強によるヒト骨肉腫細胞の 血管新生抑制効果
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 麩谷博之、長尾和磨、川口貴之、松本周也、中村優志、橘俊哉
2. 発表標題 小細胞型骨肉腫の2例
3. 学会等名 中部日本整形外科災害外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊西俊介、麩谷博之、澤井龍生、橘俊哉
2. 発表標題 ヒドララジンとバルプロ酸ナトリウムの併用によるヒト骨肉腫血管新生抑制効果の検討
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Futani h、Lui TH	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature Singapore	5. 総ページ数 495
3. 書名 Arthroscopy and Endoscopy of the Shoulder: Principle and Practice	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山根木 康嗣 (Yamanegi Koji) (00434944)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究 分担者	西浦 弘志 (Nishiura Hiroshi) (90284760)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------